

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

010263072 **Image available**

WPI Acc No: 1995-164327/199522

Agent for preventing adsorption of protein, ensuring assay with high
reproducibility and accuracy - contains 2-methacryloyl
oxyethylphosphorylcholine (co)polymer.

Patent Assignee: NIPPON OILS & FATS CO LTD (NIOF)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 7083923	A	19950331	JP 93228973	A	19930914	199522 B
JP 3443891	B2	20030908	JP 93228973	A	19930914	200359

Priority Applications (No Type Date): JP 93228973 A 19930914

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 7083923	A	6	G01N-033/531	
JP 3443891	B2	5	G01N-033/531	Previous Publ. patent JP 7083923

Abstract (Basic): JP 7083923 A

The agent contains 2-methacryloyl oxyethyl phosphorylcholine
polymer and/or a 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine contg.
copolymer(s).

Available copolymerisable monomers for the copolymer include
n-butyl (meth)acrylate, butyl (meth)acrylate, 2-hydroxyethyl
methacrylate, methyl-nucleus-substd. styrene, vinyl chloride, ethylene,
vinyl acetate and diethyl itaconate.

ADVANTAGE - The agent has high adsorption-prevention and ensures
assays with high reproducibility and accuracy.

Dwg.0/0

Derwent Class: A89; B04; J04; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/531

International Patent Class (Additional): G01N-033/543

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-83923

(43)公開日 平成7年(1995)3月31日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/531	B			
33/543	5 0 1 J	9217-2 J		
	M	9217-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平5-228973

(22)出願日 平成5年(1993)9月14日

(71)出願人 000004341

日本油脂株式会社
東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72)発明者 榊 秀次郎

茨城県つくば市春日2-20-3

(72)発明者 中田 伸治

茨城県つくば市春日2-26-2

(72)発明者 松本 竹男

茨城県つくば市東2-14-9

(72)発明者 鯉沼 康美

茨城県つくば市東新井32-16

(74)代理人 弁理士 酒井 一 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンパク質吸着防止剤

(57)【要約】

【構成】 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体及び／又は2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン含有成分の共重合体を含むタンパク質吸着防止剤。

【構成】 本発明のタンパク質吸着防止剤は、低濃度で抗体結合固相、抗原結合固相及び固相自体等へのタンパク質の吸着防止能を有するので、種々の生体関連物質の分析等に使用することにより、再現性良く高精度の分析値を得ることができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体及び／又は2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン含有成分の共重合体を含むタンパク質吸着防止剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生化学的分析法等に用いるタンパク質吸着防止剤に関し、更に詳細には、臨床試薬等の分野で広く用いられるtwo-site法（サ

【0002】

ンドイッチ測定法）等において、抗体結合固相、抗原結合固相及び固相自体等へのタンパク質の吸着を防ぐタンパク質吸着防止剤に関する。

【従来の技術】臨床診断薬等の分野で広く使用されているイムノメトリックアッセイは、一般にはtwo-site法（サンドイッチ測定法）による固相法が使われている。この測定方法は、測定すべき物質（被検物質、Ag）のエピトープを異にする2種類の抗体（Ab₁、Ab₂）を用いる。まず、合成高分子などからなる固相（SP）の表面にAb₁を固定し、これにAgを加えて結合させる。次いで、標識した抗体（Ab₂*）を反応させた後、洗浄して遊離Ab₂*を除去し、固相に結合したAb₂*（結合型、B）の標準活性を測定する。この場合Ag量に応じてBが増加し、両者間に標準曲線が得られる。この標準曲線より検体中の抗原量を測定する。また、抗原と抗体とを逆にして、即ち標識抗原を用いて、検体中の抗体量を測定する方法も用いられている（Ag₁、Ag₂*およびAbを用いて測定）。これらの標識には、通常酵素、蛍光物質あるいは発光物質等が用いられている。

【0003】これらサンドイッチ法の感度を左右する主な要因の1つは標識抗体の抗体結合固相への吸着あるいは標識抗原の抗原結合固相への吸着である。これらの吸着は、標識に用いた酵素、蛍光物質あるいは発光物質等の性質に一部依存することは十分予測しうる。酵素標識抗体の吸着は、アルカリフォスファターゼ標識抗体、グルコースオキシダーゼ標識抗体、ペルオキシダーゼ標識抗体のいずれの抗体も加えた量の3万分の1あるいはそれ以下であり、β-D-ガラクトシダーゼ標識抗体の非特異的吸着は2000分の1である（酵素免疫測定法、医学書院）。これらの吸着はサンドイッチ法における感度の低下および再現性の欠如の原因となっている。

【0004】従来、これらの吸着を防止するために、イムノアッセイを弱酸性（pH5～6）の緩衝液で行なう方法や、Ab₁を吸着させた後で、固相の余分な蛋白質結合部位を卵白アルブミン、ウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清、正常血清等を用いてブロックする方法が知られている。

【0005】しかしながら、弱酸性での操作や各種タン

2

パク質でのブロッキングでは、そのタンパク質吸着防止能は十分ではなく、臨床診断等の分野ではより優れたタンパク質吸着防止剤の開発が望まれている。

【0006】また、市販の卵白アルブミン、ウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清等には、しばしば免疫グロブリン、酵素あるいはホルモン等の混入があり、反応に影響をあたえ分析値に誤差を生じさせるため問題となっている。

【0007】

【本発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、測定系に影響を与えず、即ち酵素、蛍光物質あるいは化学発光物質等の標識物質および測定対象物質に限定されることなく、タンパク質の抗体結合固相への吸着、抗原結合固相への吸着あるいは固相への吸着等のタンパク質吸着を抑制し、高い精度で目的物質を分析することを可能にするタンパク質吸着防止剤を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（以下MPCと称す）重合体及び／又はMPC含有成分の共重合体（以下MPC共重合体と称す）を含むタンパク質吸着防止剤が提供される。

【0009】以下本発明を更に詳細に説明する。

【0010】本発明のタンパク質吸着防止剤は、例えばタンパク質、ポリペプチド、ステロイド、脂質、ホルモン等、更に具体的には各種抗原、抗体、レセプター、酵素等の一般に酵素反応あるいは免疫グロブリンの抗原抗体反応を利用して測定する生体関連物質の分析法等において使用可能な試薬である。具体的には、公知の放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA）、蛍光免疫測定法（FIA）、ラテックス比濁法等、特に好ましくは酵素免疫測定法（EIA）、蛍光免疫測定法（FIA）、ラテックス比濁法等に適用することができ、これらの公知の生化学的分析方法において、固相表面に抗体あるいは抗原を結合させた後、固相の余分なタンパク質結合部位をMPC重合体及び／又はMPC共重合体（以下総称する場合は重合体Aと称す）を有効成分として用いてブロックする。

【0011】本発明のタンパク質吸着防止剤に用いるMPC重合体及び／又はMPC共重合体は、MPCの単独重合体、他のビニルモノマーとの共重合体である。この重合体A成分中のMPC含量は、重合体Aに対し、1～100モル％が好ましく、特に5モル％以上が好ましい。前記配合割合が1モル％未満の場合には、タンパク質の吸着防止が困難になるので好ましくない。また重合体Aは、重合温度、重合開始剤使用量、重合度調整剤の使用等によっても異なるが、好ましくは数平均分子量が1000～1000000、特に好ましくは2000～70000の範囲である。

【0012】前記重合体Aを調製するには、例えば、特

3

定の重合開始剤の存在下、MPC単独あるいはMPCと共重合可能な他のビニルモノマー含有成分とを重合させる方法等により得ることができる。

【0013】前記MPCと共重合可能な他のビニルモノマーとしては、例えば(メタ)アクリル酸n-ブチル、(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸ブチル、(メタ)アクリル酸ペンチル、(メタ)アクリル酸ヘキシル、(メタ)アクリル酸ヘプチル、(メタ)アクリル酸オクチル、(メタ)アクリル酸トリデシル、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、(メタ)アクリレート、スチレン、 α -メチルスチレン、メチル核置換スチレン、クロロ核置換スチレン、塩化ビニル、塩化ビニリデン、エチレン、プロピレン、イソブチレン、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル、エチルビニルエーテル、n-ブチルビニルエーテル、ジエチルイタコネート、ジ-n-ブチルイタコネート等を挙げることができ、特にメタクリル酸エステル類等を好ましく挙げることができる。

【0014】前記重合開始剤としては、通常のラジカル重合開始剤であれば特に限定されるものではないが、例えば2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル、過酸化ベンゾイル、ジイソプロピルペルオキシジカーボネート、t-ブチルペルオキシ-2-エチルヘキサノエート、t-ブチルペルオキシシバレート、t-ブチルペルオキシジイソブチレート、過硫酸塩又は過硫酸-亜硫酸水素塩等が挙げられる。重合開始剤の使用量は、全原料モノマー100重量部に対して0.01~10重量部が好ましく、特に0.1~5重量部が望ましい。

【0015】また前記重合体Aを調製する際の重合条件は、好ましくは30~80℃、特に好ましくは40~70℃において2~72時間重合させるのが望ましい。この際、重合反応をより円滑に行なうために溶媒を用いてもよく、該溶媒としては、水、メタノール、エタノール、プロパノール、t-ブタノール、ベンゼン、トルエン、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、クロロホルム又はこれらの混合物等を挙げることができる。

【0016】本発明のタンパク質吸着防止剤は、前記重合体Aを有効成分としておれば特に限定されるものではなく、重合体Aを溶解させる溶媒を添加して使用することもできる。前記重合体Aを溶解させる溶媒としては、例えばリン酸緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液、くえん酸緩衝液、各種生理食塩水等を好ましく挙げることができ、これら溶液に商品名「Tween 20」(ICI社製)等の界面活性剤またはジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン又はN, N-ジメチルホルムアミド等の有機溶媒を、好ましくは0.01~20重量%添加することもでき、特にリン酸緩衝液、各種生理食塩水を用いるのが望ましい。

【0017】本発明のタンパク質吸着防止剤を使用するには、例えば各種生体関連物質の分析等使用する固相表

4

面に、抗体あるいは抗原を結合させた後に、タンパク質吸着防止剤で洗浄する方法等で処理すれば良く、血清あるいは標識抗体または標識抗原を添加する以前であればどの時点で行っても良い。また、血清中の分析目的物質の固相への吸着が問題とならない分析目的物質においても、標識抗体または標識抗原を添加する以前であれば良く、更に分析を実施する全ての溶液に本発明のタンパク質吸着防止剤を添加して使用することもできる。この際タンパク質吸着剤の使用量は、重合体A成分換算で、0.0001~5重量%であるのが好ましい。

【0018】前記タンパク質の吸着を防止する固相の材質は特に限定されるものではないが、例えばポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、アクリル、ポリメチルメタクリレート、ガラス、金属、セラミック、シリコンラバー等を挙げることができる。また、これら材質の形状は特に限定されるものではないが、試験管、タイタープレート、ラテックス、磁性微粒子等を挙げることができる。

【0019】

【発明の効果】本発明のタンパク質吸着防止剤は、低濃度で強いタンパク質吸着防止能を有するので、種々の生体関連物質の分析等に使用することにより、再現性良く高精度の分析値を得ることができる。

【0020】

【実施例】以下、本発明を合成例、実施例および比較例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0021】

【合成例1】

MPC重合体の合成

総モノマー濃度が1.0mmol/リットルおよび重合開始剤がモノマーに対して1mol%となるように、MPC 5.905g (0.02mol)を重合用ガラス反応管に秤取し、これに重合開始剤として2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル(以下AIBNと称す) 0.0328g (0.2mmol)及び重合溶媒としてメタノール20mlを加えた。反応管内を十分にアルゴン置換した後、密封して24時間50℃に加温することにより重合反応を行なった。得られた反応混合物を氷冷した後、400mlのジエチルエーテルに滴下することによってポリマーを沈殿させた。次いで濾別し、十分にジエチルエーテルにて洗浄した後減圧乾燥して白色粉末状ポリマー3.691gを得た。重合率は62.5%であった。また得られたポリマーのリン酸緩衝液をGPC(ゲルパーミエーションクロマトグラフィー)を用いて分析し、分子量を測定した結果、ポリエチレングリコール換算で68000であった。

【0022】

【合成例2】

MPC-メタクリル酸n-ブチル(以下BMAと称す)

共重合体の合成

MPCとBMAとのモノマー仕込みモル比がMPC/BMA=40/60、総モノマー濃度が1.0mol/リットル及び重合開始剤がモノマーに対して1mol%となるように、MPC 1.435g (4.9mmol)、BMA 2.153g (15.1mmol)を重合用ガラス反応管に秤取し、これに重合開始剤としてAIBN 0.0328g (0.2mmol)、重合溶媒としてメタノール20mlを加えた。反応管内を十分にアルゴン置換した後、密封して24時間60℃に加温することにより重合反応を行なった。得られた反応混合物を氷冷した後、400mlのジエチルエーテルに滴下することによりポリマーを沈殿させた。これを濾別し、十分にジエチルエーテルにて洗浄した後減圧乾燥して白色粉末状ポリマー2.019gを得た。重合率は56.3%であった。また得られたポリマーのテトラヒドロフラン溶液をGPCを用いて分析し、分子量を測定した結果、ポリスチレン換算で32000であった。更にモル組成比は元素分析の結果より、MPC/BMA=38.5/61.5であった。

【0023】

【参考例1】

フルオレセインイソチオシアネート標識抗体の調製
抗ヒト癌胎児性抗原 マウス抗体（以下抗ヒトCEAマウスIgGと称す）20mg/ml (0.2M炭酸ナトリウム緩衝液, pH9.0) 2.0mlに、フルオレセインイソチオシアネート（以下FITCと称す）を2.0mg加えた。次いで4℃、一晚反応させた後、リン酸ナトリウム緩衝生理食塩水（以下PBSと称す）で平衡化させたSephadex G-25カラムを用いて、FITCと結合した抗体を精製した。次に活性化したDEAE-セルロースをPBSで平衡化しておき、前記Sephadex G-25カラムで溶出したFITCと結合した抗体を添加し、PBSで溶出し、FITC標識抗体を調製した。

【0024】

【実施例1】20μg/mlのウサギ抗体PBS溶液4.0mlを、内径10mmφ×75mmのポリスチレン試験管に導入し、4℃、一晚インキュベートして物理的に吸着させた後、4.0mlのPBSにて3回洗浄を行った。次いで合成例2に準じて合成したモル組成および分子量が、MPC/BMA=30.4/69.6、Mn=26000の共重合体を0.005重量%添加したPBS溶液4.0mlを加え、4℃、一晚インキュベ-

トした後、4.0mlのPBSにて3回洗浄を行った。次いで参考例1で調製した20μg/mlのFITC標識抗ヒトCEAマウスIgGを4.0mlを加え、4℃、一晚インキュベートした後、4.0mlのPBSにて3回洗浄を行った。更に2重量%ドデシル硫酸ナトリウムを添加したPBS 4.0mlを添加することにより、吸着したFITC標識抗ヒトCEAマウスIgGを試験管より脱離させた。脱離させたFITC標識抗ヒトCEAマウスIgGを励起波長495nm、測定波長520nmにて測定した。吸着量は加えたFITC標識抗ヒトCEAマウスIgGに対するパーセントで表わし、測定結果を表1に示す。

【0025】

【実施例2】MPCとBMAとの共重合体の代わりに、MPCとメタクリル酸メチルエステル（以下MMAと称す）との共重合体（モル組成および分子量がMPC/MMA=34.4/65.6、Mn=32000）を用いた以外は実施例1と同様に行った。測定結果を表1に示す。

20 【0026】

【実施例3】MPCとBMAとの共重合体の代わりに、MPCと2-ヒドロキシエチルメタクリレート（以下HEMAと称す）との共重合体（モル組成および分子量がMPC/HEMA=21.5/78.5、Mn=30000）を用いた以外は実施例1と同様に行った。測定結果を表1に示す。

【0027】

【実施例4】MPCとBMAとの共重合体の代わりに、MPCとスチレン（以下STと称す）との共重合体（モル組成および分子量がMPC/ST=38.5/21.5、Mn=26000）を用いた以外は実施例1と同様に行った。測定結果を表1に示す。

【0028】

【実施例5】MPCとBMAとの共重合体の代わりに、MPCの重合体（Mn=68000）を用いた以外は実施例1と同様に行った。測定結果を表1に示す。

【0029】

【比較例1】MPC/BMA=30.4/69.6、Mn=26000の共重合体を0.005重量%添加したPBS溶液の代わりに、1重量%ウシ血清アルブミンを添加したPBS溶液を用いた以外は実施例1と同様に行った。測定結果を表1に示す。

【0030】

【表1】

7		8	
		吸着防止剤 (重合体組成)	吸着量(%)
実施例	1	MPC ¹ /BMA ² =30.4/69.6	0.003
	2	MPC/MMA ³ =34.4/65.6	0.003
	3	MPC/HEMA ⁴ =21.5/78.5	0.004
	4	MPC/ST ⁵ =38.5/24.5	0.002
	5	MPC (Mn=68000)	0.003
比較例		ウシ血清アルブミン	0.025

- * 1: 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン
 * 2: メタクリル酸-n-ブチルエステル
 * 3: メタクリル酸メチルエステル
 * 4: 2-ヒドロキシエチルメタクリレート
 * 5: スチレン

【0031】ウシ血清アルブミンを添加した比較例1と比較すると、本発明のタンパク質吸着防止剤は低濃度でFITC標識抗ヒトCEA マウスIgGの吸着を防止していることが判った。

【0032】

【実施例6】合成例2に準じて合成したモル組成および分子量が、MPC/BMA=30.4/69.6 (Mn=26000)の重合体0.005重量%およびウシ血清アルブミン0.6重量%を添加したPBS溶液4.0mlを、内径10mmφ×75mmのポリスチレン試験管に加え、4℃、一晚インキュベートした後、4.0mlのPBSにて3回洗浄を行った。次いで1重量%ドデシル硫酸ナトリウムを添加したPBS溶液4.0mlを加えた後、この溶液のウシ血清アルブミン量をPIERCE社製の商品名「Micro BCA Protein Assay Reagent」を用いて測定した。その結果を表2に示す。

【0033】

【実施例7】MPCとBMAとの共重合体の代わりに、MPCとMMAとの共重合体 (モル組成および分子量がMPC/MMA=64.4/65.6、Mn=32000)を用いた以外は実施例6と同様に行った。測定結果を表2に示す。

【0034】

*

		吸着防止剤 (重合体組成)	ウシ血清アルブミン (μg/試験管)
実施例	1	MPC ¹ /BMA ² =30.4/69.6	0.65
	2	MPC/MMA ³ =34.4/65.6	0.67
	3	MPC/HEMA ⁴ =21.5/78.5	0.67
	4	MPC/ST ⁵ =38.5/24.5	0.63
	5	MPC (Mn=68000)	0.69
比較例		PBS ⁶	2.36

- * 1: 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン
 * 2: メタクリル酸-n-ブチルエステル
 * 3: メタクリル酸メチルエステル
 * 4: 2-ヒドロキシエチルメタクリレート
 * 5: ポリスチレン
 * 6: リン酸ナトリウム緩衝生理食塩水

【0039】PBS溶液を用いた比較例2と比較する 50 と、本発明のタンパク質吸着防止剤がタンパク質の吸着

を防止していることは明らかである。

フロントページの続き

(72)発明者 中林 宜男
千葉県松戸市小金原5丁目6番20号

(72)発明者 石原 一彦
東京都小平市上水本町6-5-9-201